

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA P
Bureau interne

WO 9606934A1

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 15/50, C07K 14/165, A61K 39/215		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 96/06934 (43) Date de publication internationale: 7 mars 1996 (07.03.96)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR95/01128		(81) Etats désignés: AU, BR, CA, JP, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(22) Date de dépôt international: 28 août 1995 (28.08.95)			
(30) Données relatives à la priorité: 94/10379 29 août 1994 (29.08.94)		FR	Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont requises.</i>
(71) Déposant: RHONE MERIEUX [FR/FR]; 17, rue de Bourgelat, F-69002 Lyon (FR).			
(72) Inventeurs: DARTEIL, Raphaël; 29, rue de Marseille, F-69007 Lyon (FR). CORAPI, Wayne; c/o J.V. Corapi, 138 Kingdon Avenue, Staten Island, NY 10312 (US). AUDONNET, Jean-Christophe; Francis, 130, rue Duguesclin, F-69006 Lyon (FR). CHAPPUIS, Gilles-Emile; 3, rue Laurent-Vibert, F-69006 Lyon (FR).			
(74) Mandataires: BERNASCONI, Jean etc.; Cabinet Lavoix, 2, place d'Estienne-d'Orves, F-75441 Paris Cédex 09 (FR).			

+ national mark : USA

(54) Title: INFECTIOUS PERITONITIS VACCINE

(54) Titre: VACCIN DE LA PERITONITE INFECTIEUSE FELINE

(57) Abstract

Nucleotide sequences comprising the FIPV S gene or a fragment thereof, modified in at least one of the A1 and A2 antigenic regions involved in the enhancement, and use of these sequences for the expression of modified proteins and the construction of recombinant viruses or expression plasmids. The invention also concerns the use of these recombinant viruses in the form of vaccines to produce immunity to feline infectious peritonitis, the use of these expression plasmids in an immunity-producing composition by directly injecting the plasmids into the cat, and use of these modified proteins in the form of a vaccine.

(57) Abrégé

L'invention comprend les séquences nucléotidiques comprenant le gène FIPV S, ou un fragment de ce gène, modifiées dans l'une ou moins des régions antigéniques A1 et A2 impliquées dans la facilitation, ainsi que l'utilisation de ces séquences pour l'expression de protéines modifiées, et pour la construction de virus recombinants ou de plasmides d'expression, et l'utilisation des virus recombinants comme vaccins contre la péritonite infectieuse féline, l'utilisation des plasmides d'expression comme composition immunisante par injection directe desdits plasmides chez le chat, et l'utilisation des protéines modifiées comme vaccin.

VACCIN DE LA PERITONITE INFECTIEUSE FELINE

Domaine de l'invention

La présente invention a trait à des vaccins contre la Péritonite Infectieuse Féline (PIF) préparés à partir de la glycoprotéine SPIKE (S) du virus de la PIF dont les épitopes facilitants majeurs ont été modifiés par mutagénèse. Ces vaccins permettent une protection des chats vaccinés contre la PIF sans provoquer chez ces derniers le phénomène de facilitation qui conduit à une évolution accélérée de la maladie.

Etat de l'art antérieur

Le virus de la Péritonite Infectieuse Féline (FIPV = Feline Infectious Peritonitis Virus) est un virus à ARN simple brin positif, enveloppé, qui, au sein de la famille des Coronaviridae, appartient au groupe antigénique qui

monoclonaux neutralisants dirigés contre le virus de la PIF ont montré que les épitopes neutralisants majeurs sont tous situés sur la glycoprotéine S et qu'ils correspondent, à un large degré, aux épitopes impliqués dans le phénomène de facilitation (Corapi W. et al., J. Virol. 1992, 66, 6695-6705 ; Olsen C. et al., J. Virol. 1992, 66, 956-965).

Une vaccination efficace contre la PIF doit conduire à l'apparition d'anticorps neutralisants sans qu'il y ait induction d'anticorps facilitants. Un tel vaccin n'a jamais pu être mis au point jusqu'ici. Les vaccins recombinants qui ne contiennent pas la glycoprotéine S peuvent probablement fournir la meilleure alternative pour les vaccins PIF futurs, mais ces antigènes ne contribuent que partiellement à l'induction de la réponse neutralisante contre le virus PIF. Des trois antigènes viraux structuraux, seule la glycoprotéine S est capable d'induire une importante réponse neutralisante. Malheureusement, cette glycoprotéine induit aussi l'apparition concomitante d'anticorps facilitants. Malgré son importance dans l'induction d'une bonne réponse neutralisante (et donc dans la réponse protectrice), la glycoprotéine S naturelle semble jouer un rôle essentiel dans le phénomène de facilitation de la PIF et ne peut donc être utilisée pour l'instant pour la fabrication de vaccins répondant aux critères exposés plus haut.

La localisation et la caractérisation des épitopes présents sur S et en particulier ceux responsables de la neutralisation et de la facilitation est donc nécessaire pour déterminer les modifications à apporter à la glycoprotéine S (ou au gène qui code pour cette protéine) pour en faire un immunogène efficace pour la vaccination des chats contre la PIF.

La séquence nucléotidique et la séquence protéique de la glycoprotéine S du virus de la PIF ont été

séquences proposées, et n'enseigne ni comment réaliser un vaccin PIF non facilitant, ni quelles sont les régions de la glycoprotéine S impliquées dans ce phénomène.

La demande de brevet GB-A-2 282 601, publiée après la date de priorité de la présente demande, propose de réaliser un vaccin à base d'une protéine S modifiée pour éviter la facilitation, par modification ou délétion de l'un au moins des sites antigéniques dénommés D (correspond aux acides aminés 496-524), A1 (correspond aux acides aminés 531-555) et A2 (correspond aux acides aminés 584-604), de manière à rendre ces sites antigéniquement inactifs.

Des efforts importants ont été réalisés pour identifier les sites antigéniques majeurs présents sur les protéines S du virus TGEV (Transmissible Gastro-Enteritis Virus) (Correa I. et al., J. Gen. Virol. 1990, 71, 271-279 ; Delmas B. et al., J. Gen. Virol. 1990, 71, 1313-1323), BCV (Bovine CoronaVirus) (Yoo D. et al., Virology 1991, 183, 91-98), MHV (Mouse Hepatitis Virus) (Takase-Yoden S. et al., Virus Res. 1990, 18, 99-108 ; Stuhler A. et al., J. Gen. Virol. 1991, 72, 1655-1658) et FIPV (Corapi W. et al., J. Virol. 1992, 66, 6695-6705 ; Olsen C. et al., J. Virol. 1992, 66, 956-965 ; Olsen C. et al., J. Gen. Virol. 1993, 74, 745-749). Dans tous les cas, de multiples domaines neutralisants ont été identifiés, et les domaines immunodominants ont été généralement localisés sur la partie S1 de la protéine.

Les études portant spécifiquement sur le virus de la PIF ont montré l'existence sur la protéine S d'épitopes induisant à la fois une réponse neutralisante et une réponse facilitante vis-à-vis de l'infection avec FIPV (Corapi W. et al., J. Virol. 1992, 66, 6695-6705 ; Olsen C. et al., J. Virol. 1992, 66, 956-965 ; Olsen C. et al., J. Gen. Virol. 1993, 74, 745-749). Ces mêmes auteurs ont

M et N jouent un rôle dans la facilitation, c'est certainement à un degré très inférieur à celui joué par S. Au cours des études réalisées avec les différents systèmes viraux où la facilitation peut être observée, un fait constant a été mis en évidence : des épitopes individuels sont capables d'induire à la fois des anticorps neutralisants et des anticorps facilitants. Ceci a été démontré pour FIPV (Corapi W. et al., J. Virol. 1992, 66, 6695-6705 ; Olsen C. et al., J. Virol. 1992, 66, 956-965 ; Hohdatsu T. et al., Arch. Virol. 1991, 120, 207-217), pour le virus de la dengue (Morens D. et Halstead S., J. Gen. Virol. 1990, 71, 2909-2917), et pour HIV (Robinson W. Jr., J. Virol. 1991, 65, 4169-4176).

Les résultats récents des tests réalisés avec des vaccins PIF expérimentaux semblent fournir l'argument le plus solide à ce jour pour l'existence d'une relation directe entre la facilitation observée *in vitro* et la maladie accélérée *in vivo* chez le chat. L'inoculation de chats avec des recombinants du virus de la vaccine exprimant la protéine S de la souche FIPV 79-1146 sensibilise les chats et induit après épreuve une maladie accélérée chez les chats vaccinés par rapport aux chats témoins non vaccinés (Vennema H. et al., J. Virol. 1990, 64, 1407-1409). L'inoculation de recombinants vaccine exprimant soit la protéine M, soit la protéine N, n'a pas prédisposé les chats à une maladie accélérée. Ces résultats *in vivo* sont à mettre en parallèle avec les résultats *in vitro* démontrant une localisation majoritaire des épitopes facilitants sur S (Corapi W. et al., J. Virol. 1992, 66, 6695-6705 ; Olsen C. et al., J. Virol. 1992, 66, 956-965). De plus, des expériences récentes réalisées pour étudier l'efficacité d'un autre candidat vaccin pour la PIF ont démontré une association statistiquement significative entre la capacité d'un sérum de chat à induire une

et al., J. Gen. Virol. 1987, 68, 2639-2646). La nature hydrophile de cette région et le fait que les 3 anticorps monoclonaux testés reconnaissent tous ce petit domaine suggèrent que A2 est un épitope neutralisant dominant de la protéine S. Par ailleurs, l'étroite homologie mise en évidence entre le site A1 et une partie du sous-site Aa identifié sur la protéine S de TGEV (Gebauer F. et al., Virology 1991, 183, 225-238) suggère que A1, qui comprend les acides aminés 562-598 doit être également un important épitope neutralisant pour le virus FIPV.

Le rapprochement ou la liaison simultanée, par un même anticorps, des sites A1 et A2 est nécessaire pour induire la facilitation par l'intermédiaire des anticorps.

La présente invention a pour objet la modification par génie génétique de la séquence du gène FIPV S dans la région des sites A1 et/ou A2, en particulier pour modifier l'un au moins des deux sites, de préférence le site A1 de manière que la protéine exprimée présente un épitope modifié, de telle sorte qu'elle n'indue plus d'anticorps facilitants et/ou le site A2. La région A1 peut être modifiée de diverses façons avec les moyens bien connus de l'homme de l'art. On peut modifier les sites A1 ou A2 indépendamment ou simultanément.

La modification du site A2 peut consister en une modification, telle qu'une délétion totale, entraînant une perte d'antigénicité du site, mais on préfère que, comme pour le site A1, la modification exprime un épitope modifié de telle sorte que la protéine n'indue plus d'anticorps facilitants.

La région A1 a une partie commune avec la région dénommée "A2" dans la demande de brevet GB-A-2 282 601 (WO-A-95/07987) citée plus haut, mais contrairement à l'invention, celle-ci prévoit des mutations (modifications) ou des délétions entraînant une perte de l'antigénicité de

microdélétion (jusqu'à 6 acides aminés).

On évitera en général les mutations ou délétions des codons codant pour les cystéines situés dans A1 et A2.

On préférera en outre les mutations ponctuelles et en second lieu les délétions ponctuelles (sauf Cys) aux 5 mutations et délétions plus étendues.

Pour le site A1, les modifications comprennent a minima une mutation pour l'un au moins et, de préférence, les deux codons codant pour Asp 568 et pour Asp 591 pour avoir tout autre acide aminé à ces positions. A la 10 condition que les acides aminés 568 et 591 ne soient pas des Asp, tout autre acide aminé dans la région 562-598 peut être substitué à l'acide aminé naturel de la position considérée.

Les modifications du site A1 comprennent aussi 15 les délétions limitées de cette région comprenant les acides aminés 568 et/ou 591.

Pour le site A2, les modifications comprennent a minima une mutation pour l'un au moins, et de préférence, les trois codons codant pour Asp 643, Arg 649 et Arg 656 pour avoir tout autre acide aminé à ces positions. Les 20 modifications du site A2 comprennent aussi la délétion totale ou les délétions partielles de cette région comprenant les acides aminés 643, 649 et/ou 656.

La présente invention a encore pour objet 25 l'utilisation des gènes FIPV ainsi modifiés pour l'expression *in vitro* de protéines FIPV S recombinantes et pour la préparation de vaccins sous-unités purifiées pour la vaccination des chats contre la PIF.

La présente invention a aussi pour objet 30 l'utilisation des gènes FIPV S ainsi modifiés pour la construction de vecteurs viraux recombinants exprimant ces gènes modifiés. Ces vecteurs viraux peuvent être des virus recombinants réplicatifs ou non réplicatifs et plus

T7. La séquence des oligonucléotides pour l'amplification des différents fragments a été choisie de manière à couvrir l'ensemble de la région codante du gène S en 3 grands fragments d'environ 1600 paires de bases (pb) et 12 sous-fragments plus petits d'environ 400 à 500 pb. Ces oligonucléotides contiennent les sites de restriction BamHI, XbaI ou XhoI pour faciliter leur clonage. La transcription réverse de l'ARN et l'amplification de l'ADN complémentaire par une réaction d'amplification en chaîne par polymérase ont été réalisées selon des techniques standards (Sambrook J. et al., Molecular Cloning : a laboratory manual, 2ème éd., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.). L'ADN amplifié a été digéré par les enzymes appropriées et cloné dans le vecteur pBluescript (Stratagene, La Jolla, Ca.).

Les limites des différents fragments clonés à partir du gène S de la souche 79-1146 du virus FIPV sont indiquées ci-dessous : (toutes les positions font référence à la séquence du gène S de la souche FIPV 79-1146 publiée par De Groot R. et al. (J. Gen. Virol. 1987, 68, 2639-2646)).

- Fragment F1 : nucléotides 70 à 1736.
Fragment F2 : nucléotides 1519 à 3160.
Fragment F3 : nucléotides 2773 à 4428.
Fragment S1 : nucléotides 70-535.
Fragment S2 : nucléotides 394-862.
Fragment S3 : nucléotides 742-1221.
Fragment S4 : nucléotides 1045-1539.
Fragment S5 : nucléotides 1339-1734.
Fragment S6 : nucléotides 1594-2089.
Fragment S7 : nucléotides 1963-2443.

forme de trois grands fragments (F1, F2 et F3 ; figure 1) et de 12 petits sous-fragments (S1 à S12). Ces inserts FIPV ont ensuite été sous-clonés dans le vecteur pTOPE-SX en vue de leur transcription et de leur traduction *in vitro*.

5 Les réactions couplées de transcription et de traduction *in vitro* ont été réalisées en utilisant le système "TNT Reticulocyte Lysate" (Promega, Madison, WI) selon la technique recommandée par le fabricant en présence de ^{35}S -methionine (Amersham France). Pour étudier l'effet 10 de la maturation post-traductionnelle des protéines, les réactions ont également été réalisées en présence de membranes microsomalement pancréatiques de chien (Promega). Les produits de traduction ont été séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS et révélés par 15 autoradiographie.

Les essais de radio-immunoprecipitation (RIPA) ont été effectués en mélangeant 5 μl du mélange de traduction de la protéine de fusion avec 5 μl d'anticorps monoclonal ou de sérum de chat dans 200 μl de tampon TNE 20 Triton X-100 (NaCl 150 mM, Tris (pH 8,0) 50 mM, EDTA 5 mM, Triton X-100 0,1 %) et en agitant ce mélange à +4°C pendant 1 heure sous agitation. Des sérums de chat positifs et négatifs pour FIPV ainsi qu'un monoclonal dirigé contre les 25 10 premiers acides aminés de la protéine du gène 10 de T7 (anticorps monoclonal T7 Tag, Novagen) ont été utilisés comme contrôles. Les immuns complexes sont adsorbés par addition de 50 μl d'un conjugué agarose-protéine G recombinante (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) aux échantillons contenant les anticorps monoclonaux ou par 30 addition de 50 μl d'un conjugué agarose-protéine A recombinante (Boehringer Mannheim) aux échantillons contenant les sérums de chats. Les immuns complexes fixés sur l'agarose ont été centrifugés pendant 30 s et lavés deux fois en tampon RIPA (150 mM NaCl, 50 mM Tris (pH 8,0),

suggère que la glycosylation n'est pas nécessaire pour la reconnaissance des épitopes recherchés.

Exemple 3 : Séquençage des virus mutants résistants à la neutralisation par les anticorps monoclonaux anti-FIPV S (mutants "mar").

Pour localiser les sites antigéniques localisés sur le fragment S6, la région S6 de plusieurs mutants FIPV mar a été amplifiée par PCR et clonée dans le vecteur pBluescript SK+ et séquencée. La séquence des mutants mar a été établie sur des mutants mar indépendants obtenus avec le même monoclonal aussi bien qu'avec des clones issus d'amplifications PCR indépendantes avec le même mutant mar. La séquence de chaque clone a été établie sur les deux birns en utilisant le kit Sequenase (Amersham) selon la technique recommandée par le fabricant.

Les séquences obtenues ont été comparées avec la séquence homologue du virus parental 79-1146. Les mutants mar analysés sont les mutants identifiés mar 23F4.5, mar 18A7.4 et mar 24H5.4. Ces mutants ont été obtenus respectivement avec les anticorps monoclonaux 23F4.5, 18A7.4 et 24H5.4 décrits par C. Olsen (Olsen C. et al., J. Virology 1992, 66, 956-965) et w. Corapi (Corapi W. et al., J. Virology 1992, 66, 6695-6705).

Le monoclonal 23F4.5 possède un titre neutralisant de 20480 (Corapi, 1992) et induit une facilitation de l'infection *in vitro* d'au moins 100 fois le niveau normal (Olsen, 1992). Le mutant mar 23F4.5 présente des mutations aux positions 1840 et 2014 qui induisent des changements d'acides aminés dans la séquence de la protéine S pour les résidus 591 (Asp -> Tyr) et 649 (Arg -> Gly). Le monoclonal 18A7.4 possède un titre neutralisant de 5120 et induit une facilitation de l'infection *in vitro* d'au moins 100 fois le niveau normal. Le mutant mar 18A7.4

5' AAAAATATTGTACCATAAAG 3'

Les oligonucléotides A11 et A12 sont hybridés entre eux grâce à leur séquence complémentaire commune de 23 paires de bases. L'hybride ainsi obtenu sert alors, après élongation de ses extrémités 3', de matrice pour une réaction PCR utilisant les oligonucléotides A13 et A14. Cette réaction d'amplification par PCR permet d'obtenir un fragment de 159 pb. Ce fragment est alors digéré avec les enzymes de restriction HindIII et SspI pour produire un fragment HindIII-SspI de 149 pb (fragment A). Ce fragment contient le site A1 modifié à deux positions (Val au lieu de Asp à la position 568 et Tyr au lieu de Asp à la position 591). Le plasmide pFIPV-S2 est digéré par HindIII et digéré partiellement par SspI pour isoler le fragment SspI-HindIII de 1569 pb (fragment B) par Geneclean (BI0101 Inc., La Jolla, Ca.). Le vecteur PBS-SK+ est digéré par HindIII et déphosphorylé pour produire le fragment C (2960 pb).

Les fragments A, B et C sont alors ligaturés ensemble pour produire le plasmide pFIPSA1*. Ce plasmide contient le fragment HindIII-HindIII du gène FIPV S modifié pour deux acides-aminés du site A1.

Le gène FIPV S est ensuite reconstitué en remplaçant par simple clonage le fragment HindIII-HindIII naturel (positions 1696 à 3418) par le fragment HindIII-HindIII contenu dans le plasmide pFIPSA1*. Le gène complet FIPV S modifié au site A1 peut alors être utilisé pour les constructions de plasmides d'expression ou de virus recombinants.

Exemple 5 : Mutagénèse du site A2.

Les oligonucléotides suivants sont synthétisés :

SspI pour isoler le fragment HindIII-SspI de 149 pb (fragment D).

Le plasmide pFIPV-S2 est digéré par HindIII et DraI pour isoler le fragment de restriction DraI-HindIII de 1170 pb (fragment E). Le vecteur pBS-SK+ est digéré par HindIII et déphosphorylé pour donner le fragment F (2960 pb).

Les fragments C, D, E et F sont ligaturés ensemble pour donner le plasmide pFIPSA2*. Le fragment central HindIII-HindIII 1723 pb du gène FIPV S contenu dans pFIPSA2* possède un site A2 modifié au niveau de 3 acides aminés (Tyr au lieu de Asp à la position 643, Gly au lieu de Arg à la position 649, et Lys au lieu de Arg à la position 656).

Le gène FIPV S est ensuite reconstitué en remplaçant par simple clonage le fragment HindIII-HindIII naturel (positions 1696 à 3418) par le fragment HindIII-HindIII contenu dans le plasmide pFIPSA2*. Le gène complet FIPV S modifié au site A2 peut alors être utilisé pour les constructions de plasmides d'expression ou de virus recombinants.

Exemple 6 : Mutagénèse des sites A1 et A2.

Les fragments A (exemple 4), C et E (exemple 5) sont ligaturés avec le vecteur pBS-SK+, préalablement digéré par HindIII et déphosphorylé, pour donner le plasmide pFIPSA1*A2*. Le fragment central HindIII-HindIII 1723 pb du gène FIPV S contenu dans pFIPSA1*A2* présente 2 changements d'acides aminés au niveau du site A1 (voir exemple 4) et 3 changements d'acides aminés au niveau du site A2 (voir exemple 5).

Le gène FIPV S est ensuite reconstitué en remplaçant par simple clonage le fragment HindIII-HindIII naturel par le fragment HindIII-HindIII 1723 pb contenu

REVENDICATIONS

1. Séquence nucléotidique comprenant le gène FIPV
5 S, présentant au moins une modification
 - dans la région antigénique A1 qui code pour les acides aminés 562 à 598 de manière que la protéine exprimée présente un épitope modifié de telle sorte qu'elle n'indue plus d'anticorps facilitants, et/ou
 - dans la région antigénique A2 qui code pour les acides aminés 637 à 662 de manière que la protéine exprimée n'indue plus d'anticorps facilitants.
- 10 2. Séquence nucléotidique selon la revendication 1, caractérisée en ce que la modification dans la région antigénique A2 est telle que la protéine exprimée présente un épitope modifié de telle sorte qu'elle n'indue plus d'anticorps facilitants.
- 15 3. Séquence nucléotidique selon la revendication 1 ou 2, comprenant une mutation dans l'un au moins des codons codant pour Asp 568 et Asp 591.
- 20 4. Séquence nucléotidique selon l'une des revendications 1 à 3, comprenant une délétion de l'un au moins des codons codant pour les acides aminés 568 et 591.
- 25 5. Séquence nucléotidique selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, comprenant une délétion incluant l'un au moins des codons codant pour les acides aminés 568 et 591.
- 30 6. Séquence nucléotidique selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, comprenant une mutation dans l'un au moins des codons codant pour Asp 643, Arg 649 et Arg 656.
7. Séquence nucléotidique selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, comprenant une délétion de l'un au moins des codons codant pour les acides aminés 643, 649 et 656.
8. Séquence nucléotidique selon la revendication

- 25 -

RHONE MERIEUX

DARTEIL Raphael - CORAPI Wayne - AUDONNET Jean-Christophe -
Francis - CHAPPUIS Gilles-Emile

L'invention comprend les séquences nucléotidiques
comportant le gène FIPV S, ou un fragment de ce gène,
5 modifiées dans l'une au moins des régions antigéniques A1
et A2 impliquées dans la facilitation, ainsi que
l'utilisation de ces séquences pour l'expression de
protéines modifiées, et pour la construction de virus
recombinants ou de plasmides d'expression, et l'utilisation
10 des virus recombinants comme vaccins contre la péritonite
infectieuse féline, l'utilisation des plasmides
d'expression comme composition immunisante par injection
directe desdits plasmides chez le chat, et l'utilisation
15 des protéines modifiées comme vaccin.

Figure néant

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 95/01128

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 66, no. 11, pages 6695-6705, CORAPI, W. ET AL. 'Monoclonal antibody analysis of neutralization and antibody-dependent enhancement of feline infectious peritonitis virus' cited in the application see the whole document ---	1-13
A	JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY, vol. 68, no. 10, READING GB, pages 2639-2646, DE GROOT, R. ET AL. 'cDNA cloning and sequence analysis of the gene encoding the peplomer protein of feline infectious peritonitis virus' cited in the application ---	
P,X	WO,A,95 07987 (SOLVAY ;BUBLOT MICHEL (FR); WANNEMAEKER CATHERINE DE (BE); COLAU D) 23 March 1995 see page 5, line 4 - page 17 see examples 15,16,19 see claims ---	1-13
P,X	JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 69, no. 5, May 1995 pages 2858-2862, CORAPI, W. ET AL. 'Localization of antigenic sites of the S glycoprotein of feline infectious peritonitis virus involved in neutralization and antibody-dependent enhancement' see the whole document -----	1-9

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Den : Internationale No

PCT/FR 95/01128

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 C12N15/50 C07K14/165 A61K39/215

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C07K C12N A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porte la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Categorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO,A,93 23422 (SMITHKLINE BEECHAM CORP ;MILLER TIMOTHY J (US); KLEPFER SHARON (US) 25 Novembre 1993 voir page 9, ligne 31 - page 11, ligne 14 voir page 22, ligne 5 - ligne 29 voir page 26 - page 31 voir exemples 7-10 ---	1,2,4,5, 7-13
A	JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY, vol. 74, READING GB, pages 745-749, OLSEN, C. ET AL. 'Identification of antigenic sites mediating antibody-dependent enhancement of feline infectious peritonitis virus infectivity' cité dans la demande voir le document en entier ---	1-13 -/-

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *'A' document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *'E' document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *'L' document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou être utilisé pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *'O' document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *'P' document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *'T' document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *'X' document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *'Y' document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *'&' document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

10 Janvier 1996

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

16.01.96

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentzaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Andres, S

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande Internationale No

PCT/FR 95/01128

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO-A-9323422	25-11-93	AU-B- 4240493 AU-B- 4241093 CA-A- 2135201 EP-A- 0640096 EP-A- 0640097 JP-T- 7508176 WO-A- 9323421	13-12-93 13-12-93 25-11-93 01-03-95 01-03-95 14-09-95 25-11-93

WO-A-9507987	23-03-95	GB-A- 2282601 AU-B- 7615894	12-04-95 03-04-95
